

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 05-133958

(43)Date of publication of application : 28.05.1993

(51)Int.Cl.

G01N 33/68
G01N 33/50
// G01N 27/62

(21)Application number : 03-300818

(71)Applicant : SEIKO INSTR INC

(22)Date of filing : 15.11.1991

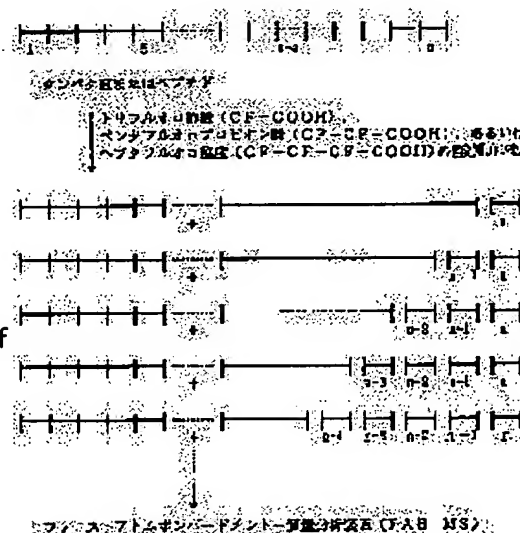
(72)Inventor : TSUGITA AKIRA
TAKAMOTO KEIJI
SATAKE KAZUO
UCHIDA TOYOAKI

(54) METHOD OF DETERMINING AMINO ACID SEQUENCE FROM CARBOXYL TERMINAL OF PROTEIN OR PEPTIDE

(57)Abstract:

PURPOSE: To determine an amino acid sequence from a carboxyl terminal of protein or peptide with a handy operation without using any enzyme.

CONSTITUTION: Protein or peptide is given acid anhydride of organic acid expressed by the formula of $\text{CF}_3-(\text{CF}_2)_n-\text{COOH}$ (n is integer of 0 or more), for example, the acid anhydride of trifluoroacetic acid ($n=0$), pentafluoropropionic acid ($n=1$) or heptafluorobutyric acid ($n=2$) to make the acid anhydride act thereon. The resulting reaction mixture is applied to a mass spectrograph to obtain a mass spectrum and the mass of chemical species contained in the reaction mixture is measured thereby determining an amino acid sequence from a carboxyl terminal of the protein or peptide.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

14.11.1995

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

2686506

[Date of registration]

22.08.1997

[Number of appeal against examiner's decision]

THIS PAGE BLANK (USPTO)

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 5 - 1 3 3 9 5 8

(43) 公開日 平成 5 年 (1993) 5 月 2 8 日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G01N 33/68		7055-2J		
33/50		P 7055-2J		
// G01N 27/62	ZNA	V 7363-2J		

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願平 3 - 3 0 0 8 1 8
(22) 出願日 平成 3 年 (1991) 1 1 月 1 5 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 2 3 2 5
セイコー電子工業株式会社
東京都江東区亀戸 6 丁目 3 1 番 1 号
(72) 発明者 次田 皓
千葉県柏市泉町 1 7 - 2 8 石塚ビル 3 0
5
(72) 発明者 高本 圭司
千葉県流山市西深井 6 3 7 - 3 パナハイ
ツルネサンス 1 0 4
(72) 発明者 佐竹 一夫
神奈川県川崎市多摩区三田 4 - 8 - 2 7
- 3 0 3
(74) 代理人 弁理士 林 敬之助

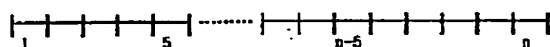
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法

(57) 【要約】

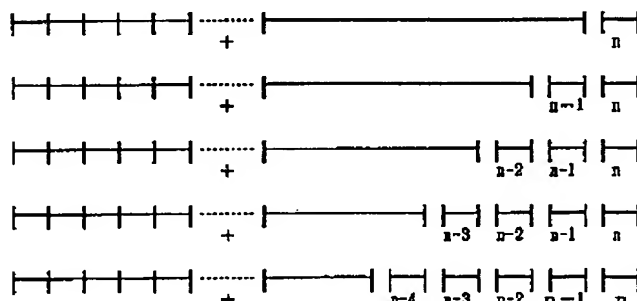
【目的】 酵素を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。

【構成】 タンパク質あるいはペプチドに一般式、 $CF_n - (CF_2)_n - COOH$ (n は 0 以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸 ($n = 0$)、ペンタフルオロプロピオン酸 ($n = 1$) あるいはヘプタフルオロ酪酸 ($n = 2$) の酸無水物を作用させ、その結果生じた反応混合物を質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得て、反応混合物に含まれる各化学種の質量を測定することにより、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。



タンパク質またはペプチド

トリフルオロ酢酸 ($CF_3 - COOH$)、
ペンタフルオロプロピオン酸 ($CF_3 - CF_2 - COOH$)、あるいは
ヘプタフルオロ酪酸 ($CF_3 - CF_2 - CF_2 - COOH$) の酸無水物



ファーストアトムボンバードメント質量分析装置 (FAB-MS)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 タンパク質あるいはペプチドに、一般式、
 $CF_3-(CF_2)_n-COOH$ (n は 0 以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物を作用させることを特徴とした、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 2】 タンパク質あるいはペプチドに作用させる上記有機酸の酸無水物は、揮発性有機溶媒を用いた溶液として用いることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 3】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させる温度は $0^{\circ}C$ 以下であることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 4】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させる時間は 5 時間以内であることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 5】 タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させた反応混合物に水またはその蒸気を作用させることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 6】 上記タンパク質あるいはペプチドに上記有機酸の酸無水物を作用させた反応混合物に水またはその蒸気を作用させた反応生成物を、質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得ることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、タンパク質あるいはペプチドの 1 次構造解析法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端 (C 末端) からのアミノ酸配列を決定するためには、図 2 に示すようにタンパク質あるいはペプチドにカルボキシペプチダーゼを作用させ、酵素消化液を経時的に 1 部ずつ採取し、その酵素消化液をアミノ酸分析装置で分析して、遊離されたアミノ酸を定量する方法が用いられてきた。(日本生化学会編、生化学実験講座第 1 巻、タンパク質の化学 2、203-211 ページ、1976 年発行)

また、その酵素消化液を質量分析装置にかけて、C 末端側のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドの質量を測定する方法も報告されている。(A. Tsugita, R.

van den Broek, M. Pyzybylski, FEBS. Lett. 137, 19 (1982))

さらに図 3 に示すように、C 末端を無水酢酸で活性化し、トリメチルシリルイソチオシアネート (TMS-ITC) を結合させた後に、塩酸で切断する、という一連の操作を繰り返すことを利用した配列分析法も報告されている。(D. H. Hawke, H. W. Lahm, J. E. Shively, C. W. Todd, Anal. Biochem. 166, 298 (1987))

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 従来のカルボキシペプチダーゼを用いる方法は、酵素の基質特異性や活性が C 末端アミノ酸あるいはそれに隣接するアミノ酸によってさまざまであること、そして他の酵素の混在があることから正確な分析が困難になることがあり、また酵素の自己消化性によってアミノ酸が遊離されるため高感度分析には適していなかった。

【0004】 また、TMS-ITC を用いる方法は 3 種類の試薬を繰り返し作用させる必要があるため操作が煩雑であるばかりでなく、繰り返し収率が悪いためいまだ実用化されるに至っていない。そこで本発明は、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定する方法を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明においては、上記の欠点を克服し C 末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $CF_3-(CF_2)_n-COOH$ (n は 0 以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸 ($n=0$)、ペンタフルオロプロピオン酸 ($n=1$) あるいはヘプタフルオロ酪酸 ($n=2$) の酸無水物を作用させた。

【0006】

【作用】 上記手段により、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく、簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になる。

【0007】

【実施例】 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明する。

(実施例 1) ここでは実験方法の詳細を述べる。図 1 は本発明の分析方法を示す工程図である。タンパク質あるいはペプチドにトリフルオロ酢酸 (TFA)、ペンタフルオロプロピオン酸 (PFPA)、あるいはヘプタフルオロ酪酸 (HFBA) の酸無水物を作用させ、C 末端からのペプチド鎖の逐次切断反応を生じさせる。さらに、この反応混合物に水を作用させた後、ファーストアトムボンバードメント質量分析装置 (FAB-MS) にかけて質量スペクトルを得る。

【0008】本発明の分析手順は以下のとおりである。まずタンパク質あるいはペプチドを含む試料溶液 1 を小試験管 2 に入れた後乾燥させる。この試験管をあらかじめ TFA、PFPA、あるいは HFBA の酸無水物のアセトニトリル溶液 3（酸無水物の濃度は 10%）を入れておいた試験管 4 に入れる。この際、試料 1 と有機酸の酸無水物 3 とは互いに接していない。次いで、この外側の試験管を零下 30°C の温度で、減圧しながら封管する。そしてこの試験管を零下 18°C に保つ（図 4）。この後、封管をあけて減圧乾燥させる。乾燥された試料

にピリジンを含む弱アルカリ性条件下で水の蒸気を作作用させた後、ジメチルホルムアミドで溶解し、さらにグリセロールと混合した後、FAB-MS によって分析する。

【0009】ここで述べた最後の水処理操作は必ずしも必要としない。用いた質量分析の条件は以下のとおりである。

FAB-MS
装置本体：日本電子製 HX110 型
イオン化法：FAB（ポジティブ）
イオン化ガス：キセノン
加速電圧：10 kV
マトリックス：グリセロール

（実施例 2）本発明を説明するために、ここでは配列番号 1 のオクタペプチド、Lys-Lys-Lys-His-Pro-Asp-Tyr-Ile、を試料ペプチドとして選び実験を行った。以下の説明においては、例えば Lys-Lys-Lys-His はペプチド 1-4、のように呼ぶこととする。

【0010】図 6 は TFA、図 7 は PFPA そして図 8 は HFBA の酸無水物をそれぞれ作用させた反応混合物を FAB-MS によって分析した結果を示したものである。この時、用いた酸無水物の濃度はそれぞれ 10% であり、零下 18°C において 2 時間作用させた。図 5 は比較のために、有機酸の酸無水物を作用させていない配列番号 1 のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。

【0011】TFA の酸無水物を作用させた場合に C 末端からの配列分析ができることが図 6 に示されている。それぞれ TFA が付加した（アシル化された）ペプチド 1-8（1-8+Acyl と表記する）、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 が検出されており、C 末端から 6 残基のアミノ酸配列が決定されることがわかる。また、-H₂O 印で示したように、各ペプチドから水が 1 分子失われた生成物に由来するピークも観測されている。

【0012】図 7 からわかるように、PFPA の酸無水物を作用させた場合にも、それぞれ PFPA が付加したペプチド 1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、およびアミノ末端のアミノ酸（1+Acyl と表記する）が検出されており、C 末端から全てのアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際同時に、PFPA が 2 個付加したペ

プチド 1-8（同様に 1-8+diAcyl と表記する）も検出されている。さらに、-H₂O 印で示したように、前述の各ペプチドから水が 1 分子失われた生成物も検出されている。

【0013】HFBA の酸無水物を作用させた場合にも、同様に C 末端からの配列分析ができることが図 8 に示されている。それぞれ HFBA が付加したペプチド 1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 およびアミノ末端のアミノ酸が検出されており、C 末端から全てのアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際も同時に、HFBA が 2 個付加したペプチド 1-8 も検出されている。また同様に、-H₂O 印で示したように、前述の各ペプチドから水が 1 分子失われた生成物も検出されている。

【0014】そして、上記のいずれの場合においてもペプチド鎖内部のペプチド結合の開裂によって生成するペプチドは検出されていない。そのため、配列分析のためのデータの解析が容易である。このように、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $CF_3-(CF_2)_n-COOH$ （n は 0 以上の整数）で表わされる有機酸の、酸無水物を作用させた反応生成物を質量分析装置にかけることにより質量スペクトルを得て、各生成物の質量を測定することによって、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定出来ることがわかった。

【0015】（実施例 3）次に、有機酸の酸無水物を作用させる際の反応温度の配列分析に及ぼす影響を調べた。ここでは、配列番号 2 のドデカペプチド Ala-Arg-Gly-Ile-Lys-Gly-Ile-Arg-Gly-Phe-Ser-Gly を用い、PFPA の酸無水物を作用させた。それぞれ、図 10 は零下 18°C、図 11 は 0°C で、それぞれ 2 時間 PFPA の酸無水物を作用させた反応混合物を質量分析装置にかけた結果である。

【0016】図 9 は比較のために有機酸の酸無水物を作用させていない配列番号 2 のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。図 10、および図 11 において、各反応条件下でそれぞれ PFPA が付加したペプチド 1-12、1-11、1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2 が検出されており、これらの条件下で C 末端から 10 残基のアミノ酸配列が決定されることがわかる。この際同時に、それぞれ PFPA が 2 個付加したペプチド 1-12 も検出されている。

【0017】また、図 11 に示されるように、0°C で 2 時間 PFPA の酸無水物を作用させた場合には、PFPA が 2 個付加したペプチド 1-11、も検出されている。さらにこの場合、同定されていないピークがより多く検出されている。この結果から、より低温で処理した場合に副反応生成物に由来するシグナルの数が少なく、かつ主反応生成物由来のシグナルの相対強度が高いことがわかる。

【0018】（実施例 4）図 14 乃至図 17 は、有機酸

10

20

30

40

50

の酸無水物を作用させる反応時間の、アミノ酸配列分析に及ぼす影響を調べた結果である。ここでは、配列番号 3 のアミノ酸 2 3 残基から成るペプチドを用い、P F P A の酸無水物を零下 1 8 ° C において、それぞれ 1 0 分間 (図 1 4) 、 3 0 分間 (図 1 5) 、 1 時間 (図 1 6) 、そして 5 時間 (図 1 7) 作用させた。

【 0 0 1 9 】 図 1 3 は比較のために有機酸の酸無水物を作用させていない配列番号 3 のペプチドそのものを分析した結果を示したものである。1 0 分間作用させた場合 (図 1 4) には、配列分析に必要な 1 連のペプチドの生成を示すシグナルの強度は低かったが、ペプチド 1-22, 1-21, 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8 が検出された。また P F P A によるアシル化は、ペプチド 1-22, 1-21 に起きていることが認められた。

【 0 0 2 0 】 3 0 分間作用させた場合 (図 1 5) には、ペプチド 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4 が検出された。この場合には、P F P A によるアシル化は完全ではない。また、1 時間 (図 1 6) および 5 時間 (図 1 7) 作用させた場合には、それぞれ P F P A が付加したペプチド 1-20, 1-19, 1-18, 1-17, 1-16, 1-15, 1-14, 1-13, 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4 が十分検出されている。そして、これら 2 つの条件下では得られた各シグナルの強度はほぼ同じである。

【 0 0 2 1 】 このことから、有機酸の酸無水物を作用させる時間は 5 時間以内でよいことがわかる。

(実施例 5) 図 1 2 は、配列番号 2 のドデカペプチドに零下 1 8 ° C で 2 時間 P F P A の酸無水物を作用させた後乾燥させた反応混合物に、さらにピリジンを含む弱アルカリ性条件下で水を作用させた後、分析した結果を示したものである。

【 0 0 2 2 】 図 1 1 との比較からわかるように、それぞれ P F P A が付加したペプチド 1-12, 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 から水が 1 分子失われた一連のペプチドの検出強度が低くなっていることから、この条件によればより容易に配列分析が解析可能であることがわかる。以上述べてきた結果をまとめると次のようになる。

【 0 0 2 3 】 乾燥されたペプチドに、一般式、 $\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$ (n は 0 以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物を作用させ、その反応混合物を F A B - M S にかけることにより、試料としたペプチド及びそのペプチドの C 末端のアミノ酸が逐次分解反応によって切断された一連のペプチドの質量スペクトルを得ることができる。これを解析することによって、試料としたペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定すること

ができる。

【 0 0 2 4 】 有機酸の酸無水物を作用させる反応時間は 5 時間以内で十分ある。反応温度を 0 ° C 以下とすることによって、副反応の進行を低く抑えることができる。また、有機酸の酸無水物を作用させた後、反応生成物に水を作用させることにより、脱水ピークを低く抑えることができ、解析が容易になる。またこの方法の特徴は、ペプチド鎖内部のペプチド結合の開裂によって生成するペプチドが検出されないため、配列分析のためのデータの解析が容易なことである。

【 0 0 2 5 】

【 発明の効果 】 本発明の重要な点は、タンパク質あるいはペプチドに、一般式、 $\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$ (n は 0 以上の整数) で表される有機酸の、酸無水物、例えばトリフルオロ酢酸 ($n = 0$) 、ペンタフルオロプロピオン酸 ($n = 1$) あるいはヘプタフルオロ酪酸 ($n = 2$) の酸無水物を作用させることにより、酵素あるいは他の複雑な有機化合物を用いることなく簡便な操作でタンパク質あるいはペプチドの C 末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になったことである。

【 0 0 2 6 】 よって、本発明によるタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法はその工業的価値が大である。

(配列表)

配列番号 : 1

配列の長さ : 8

配列の形 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Lys Lys Lys His Pro Asp Tyr Ile

1

5

配列番号 : 2

配列の長さ : 1 2

配列の形 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Ala Arg Gly Ile Lys Gly Ile Arg Gly Phe Ser Gly

1

5

10

配列番号 : 3

配列の長さ : 2 3

配列の形 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

7 8
配列
Gly Ile Gly Lys Phe Leu His Ser Ala Gly Lys Phe Gly Lys Ala
1 5 10 15
Phe Val Gly Glu Ile Met Lys Ser
20

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の分析方法を示す工程図である。

【図2】カルボキシペプチダーゼを用いた場合の従来の分析方法を示す工程図である。

【図3】トリメチルシリルイソチオシアナートを用いた 10
場合の従来の分析方法である。

【図４】本発明の分析に用いる試料の封管状態を示す模式図である。

【図5】酸無水物を作用させていない配列番号1のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図6】PFP Aの酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図7】HFB Aの酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 8】TFA の酸無水物を作用させた反応混合物を分 20
析した結果を示す図である。

【図 9】酸無水物を作用させていない配列番号 2 のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図10】零下18°Cで2時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図 11】 0 ° C で 2 時間酸無水物を作用させた反応混

合物を分析した結果を示す図である。

【図 12】 零下 18°C で 2 時間酸無水物を作用させた後乾燥させた反応混合物にさらにピリジンを含む弱アルカリ性条件下で水を作用させた後、分析した結果を示す図である。

【図 13】酸無水物を作用させていない配列番号 3 のペプチドそのものを分析した結果を示す図である。

【図14】零下1.8°Cで10分間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図15】零下18°Cで30分間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

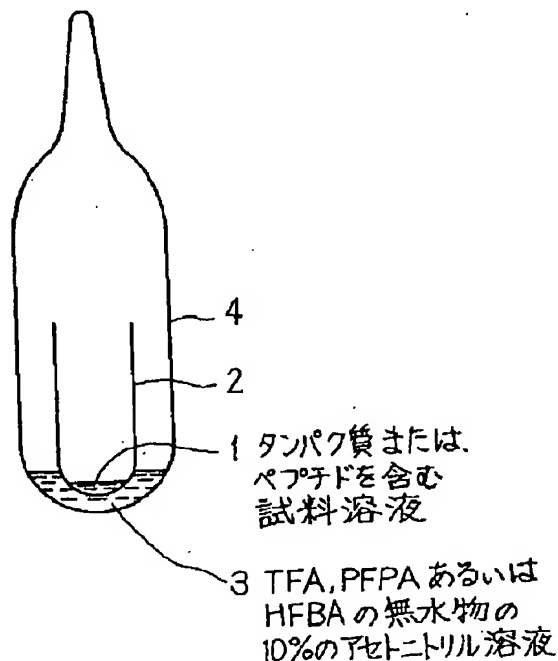
【図16】零下18°Cで1時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

【図17】零下18°Cで5時間酸無水物を作用させた反応混合物を分析した結果を示す図である。

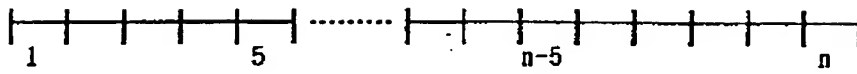
【符号の説明】

- 1 試料溶液
- 2 小試験管
- 3 有機酸の酸無水物の溶液
- 4 試験管

【図 4】

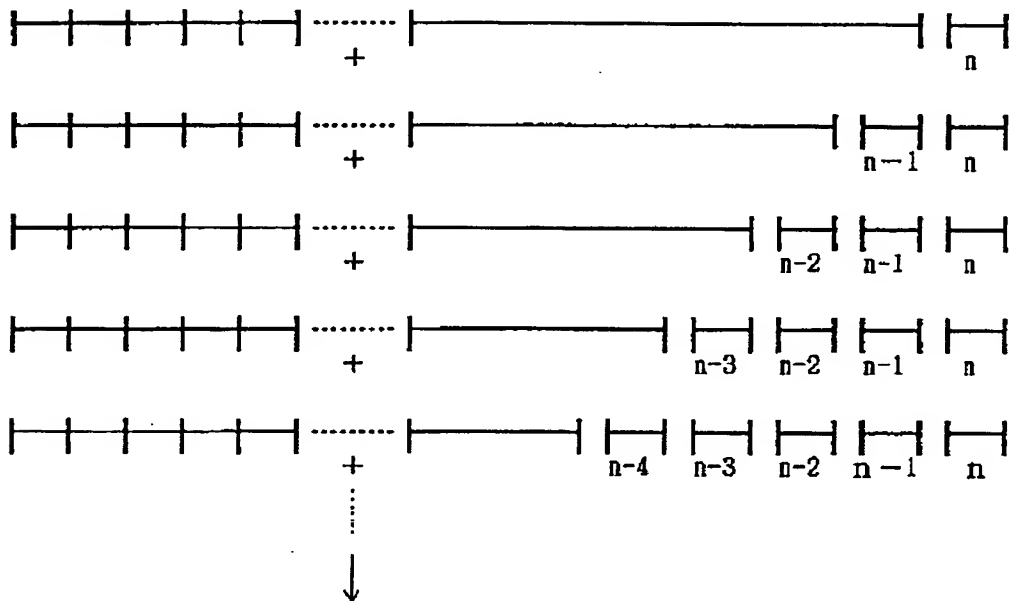


【 図 1 】



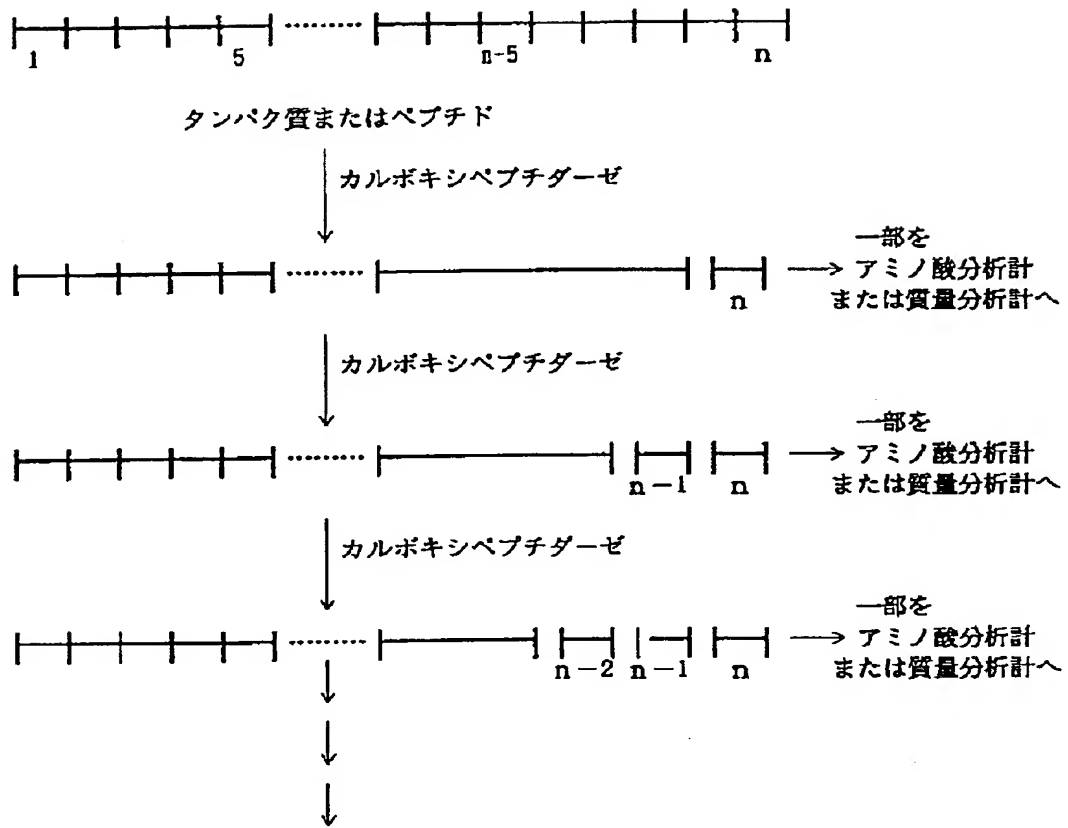
タンパク質またはペプチド

トリフルオロ酢酸 ($\text{CF}-\text{COOH}$),
 ↓
 ペンタフルオロプロピオン酸 ($\text{CF}-\text{CF}-\text{COOH}$), あるいは
 ヘプタフルオロ酪酸 ($\text{CF}-\text{CF}-\text{CF}-\text{COOH}$) の酸無水物

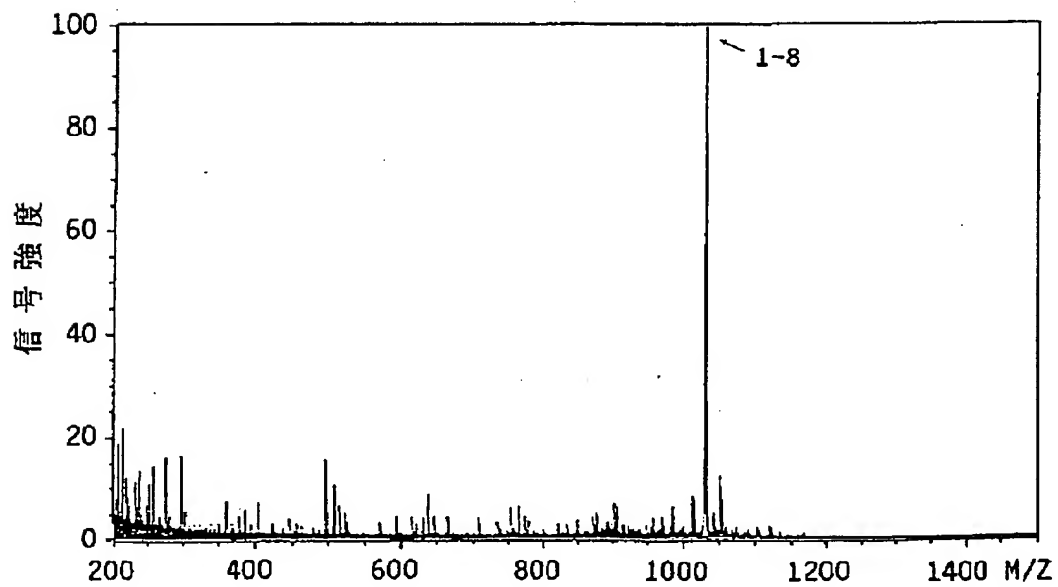


ファーストアトムボンバードメントー質量分析装置 (FAB-MS)

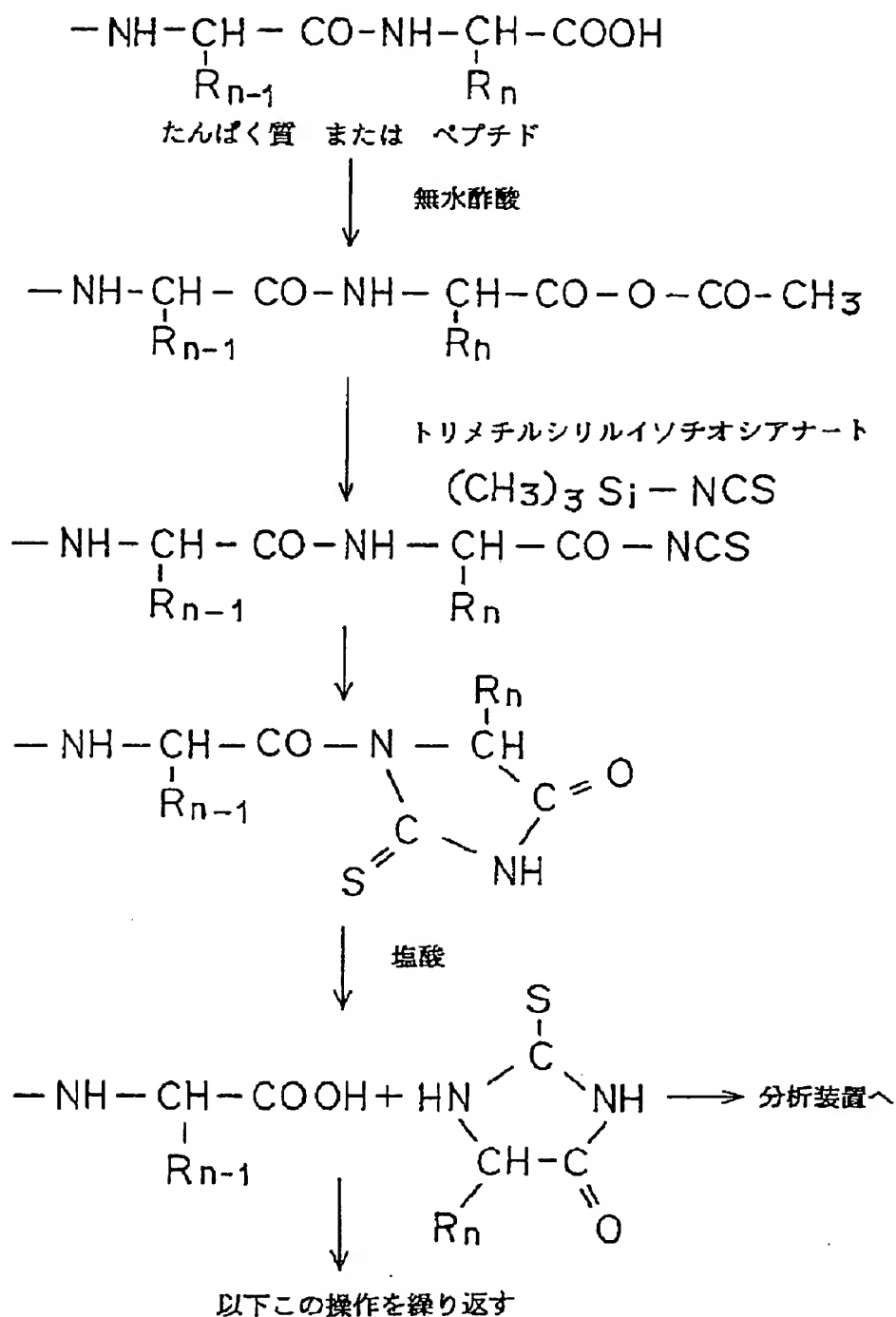
【図 2】



【図 5】

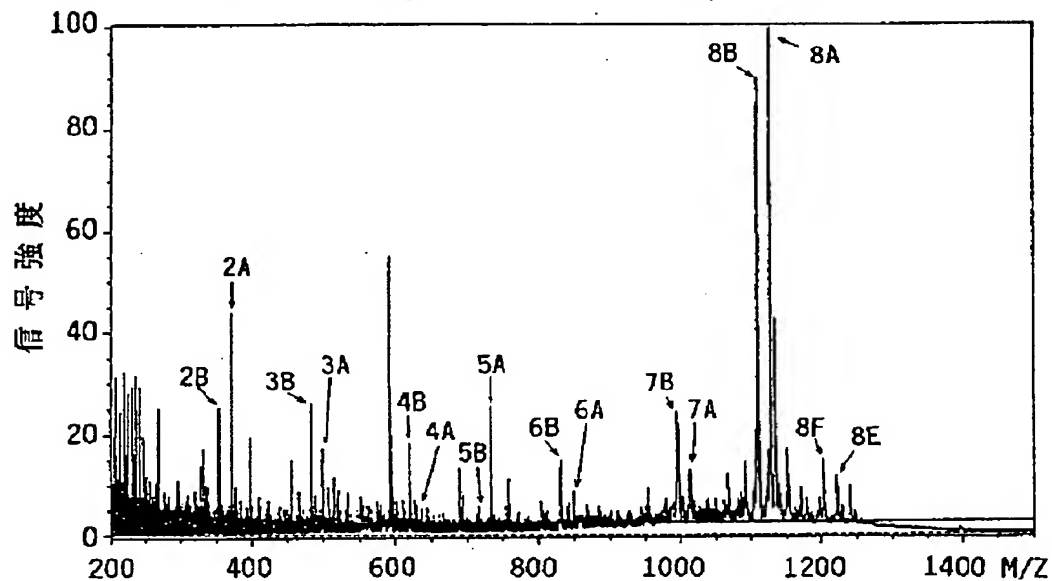


【図 3】

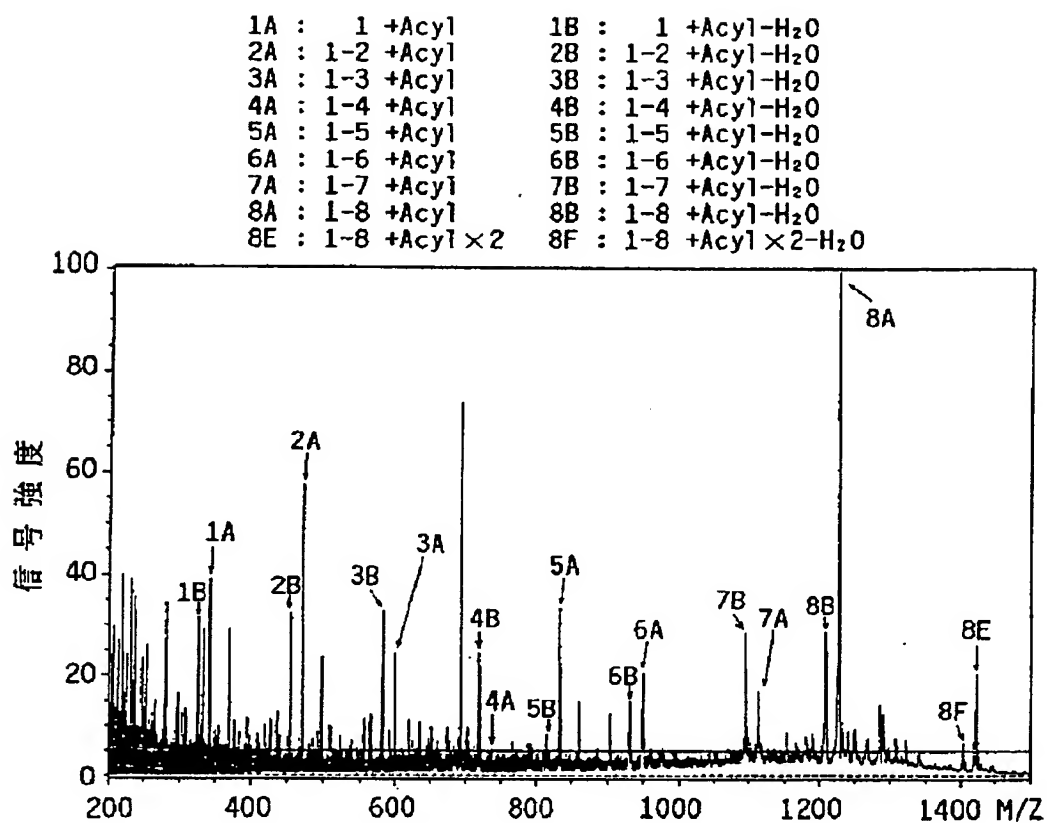


【図 6】

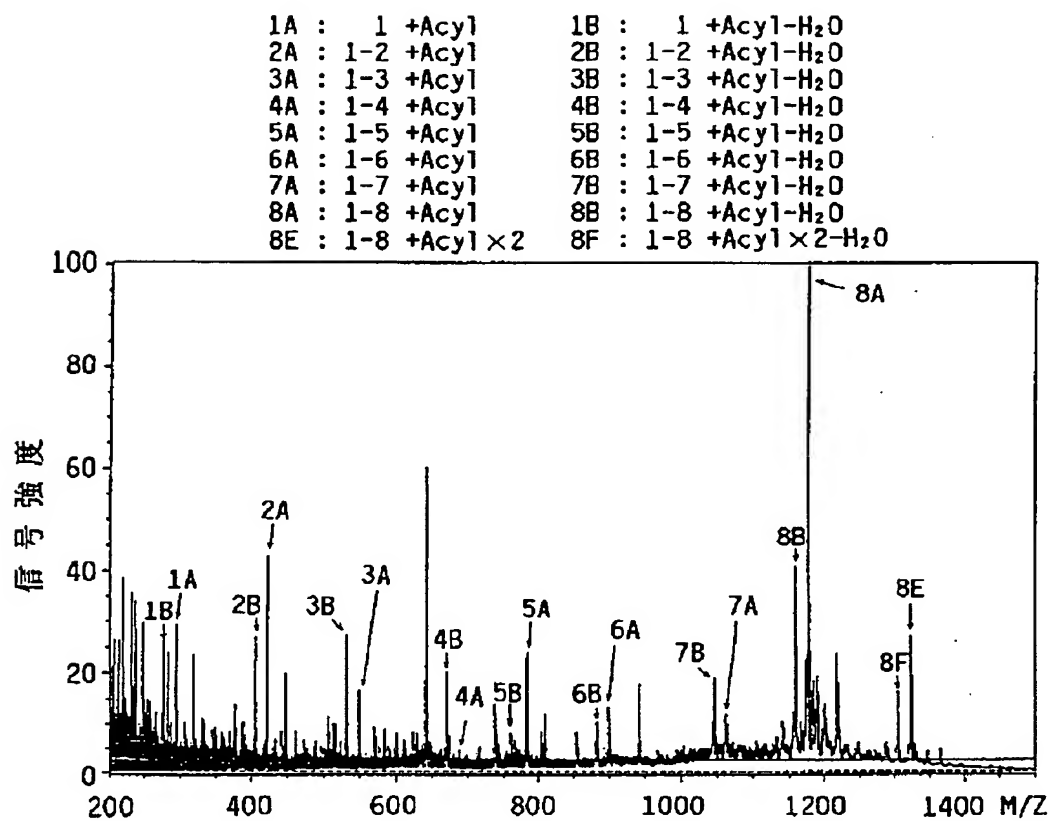
2A : 1-2 +Acyl	2B : 1-2 +Acyl-H ₂ O
3A : 1-3 +Acyl	3B : 1-3 +Acyl-H ₂ O
4A : 1-4 +Acyl	4B : 1-4 +Acyl-H ₂ O
5A : 1-5 +Acyl	5B : 1-5 +Acyl-H ₂ O
6A : 1-6 +Acyl	6B : 1-6 +Acyl-H ₂ O
7A : 1-7 +Acyl	7B : 1-7 +Acyl-H ₂ O
8A : 1-8 +Acyl	8B : 1-8 +Acyl-H ₂ O
8E : 1-8 +Acyl × 2	8F : 1-8 +Acyl × 2-H ₂ O



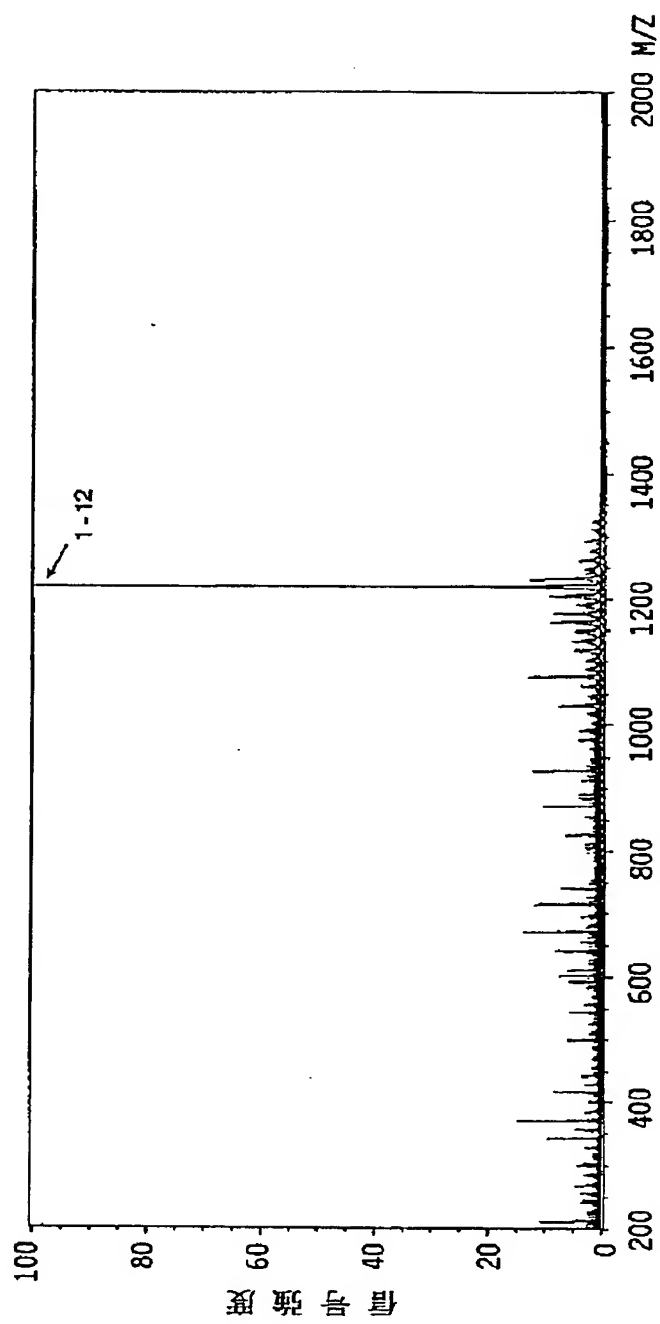
【 図 7 】



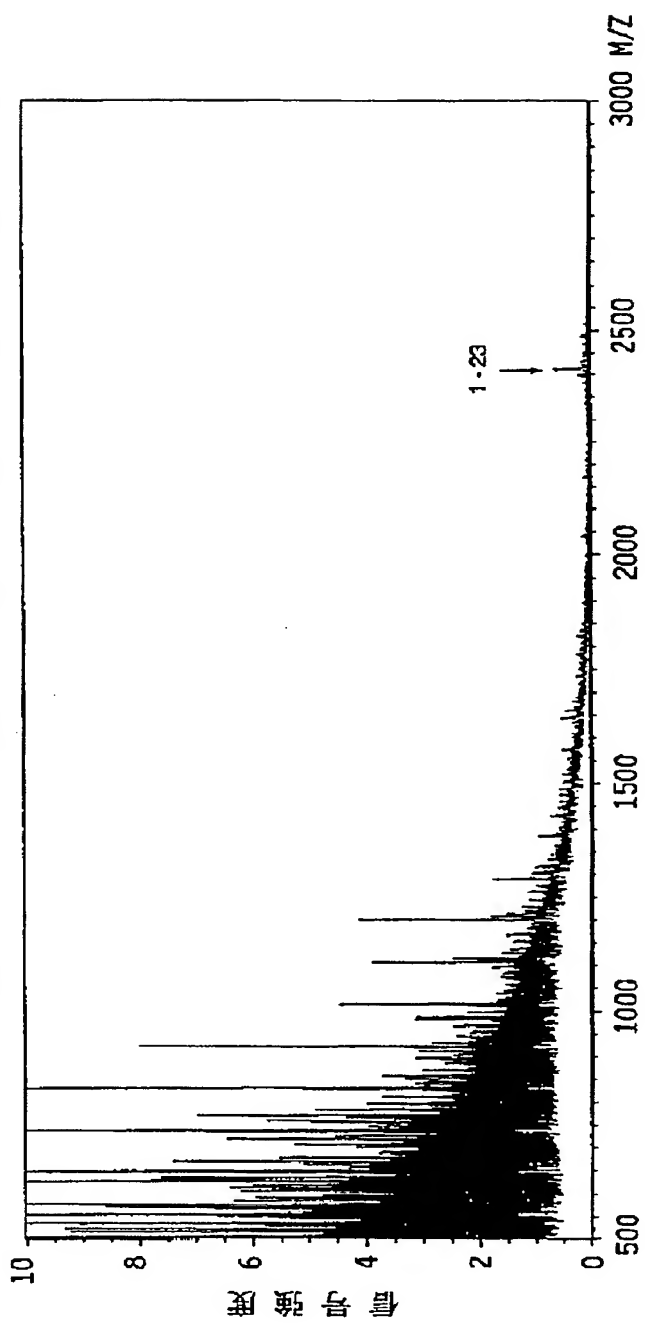
【図 8】



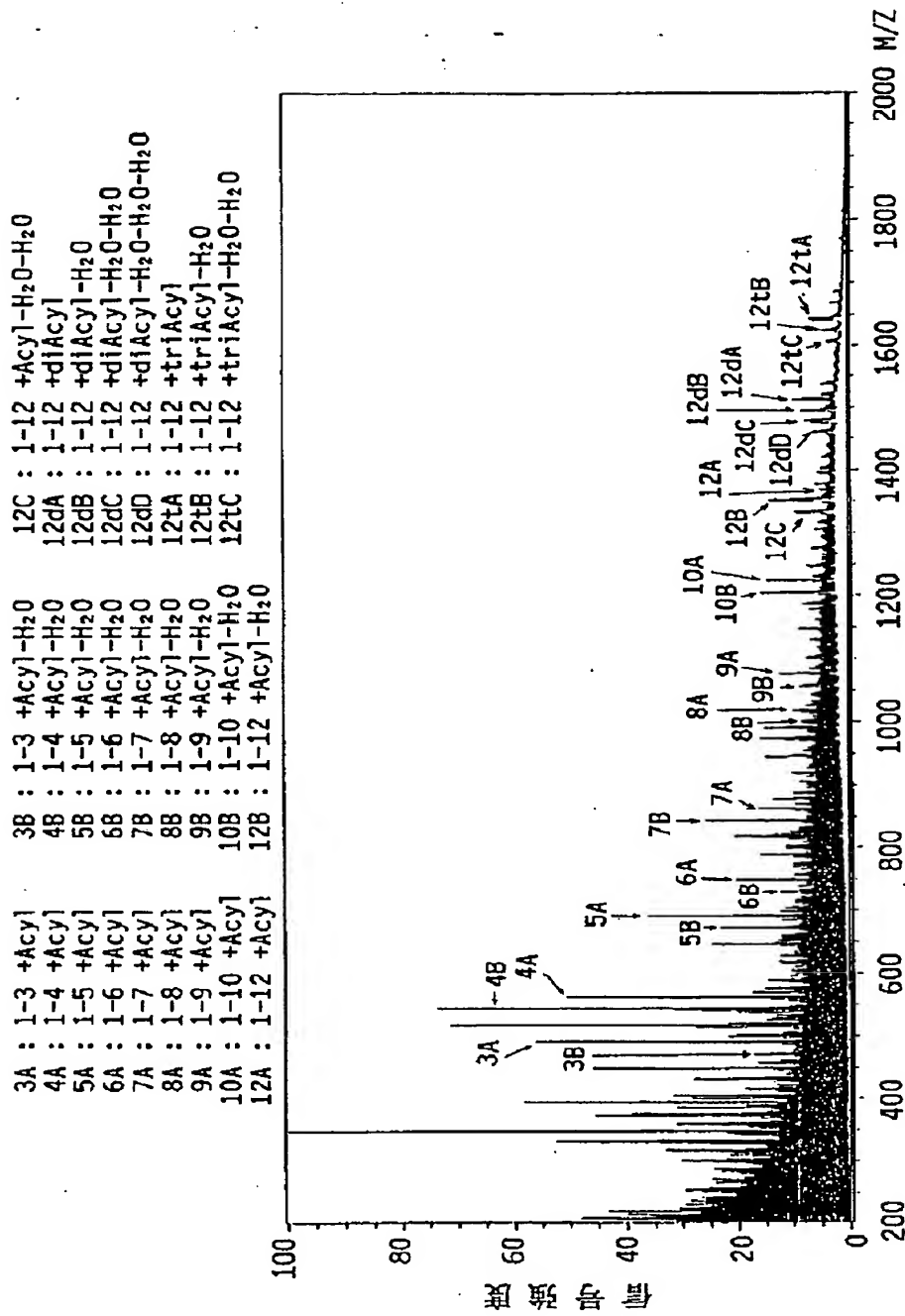
【図9】



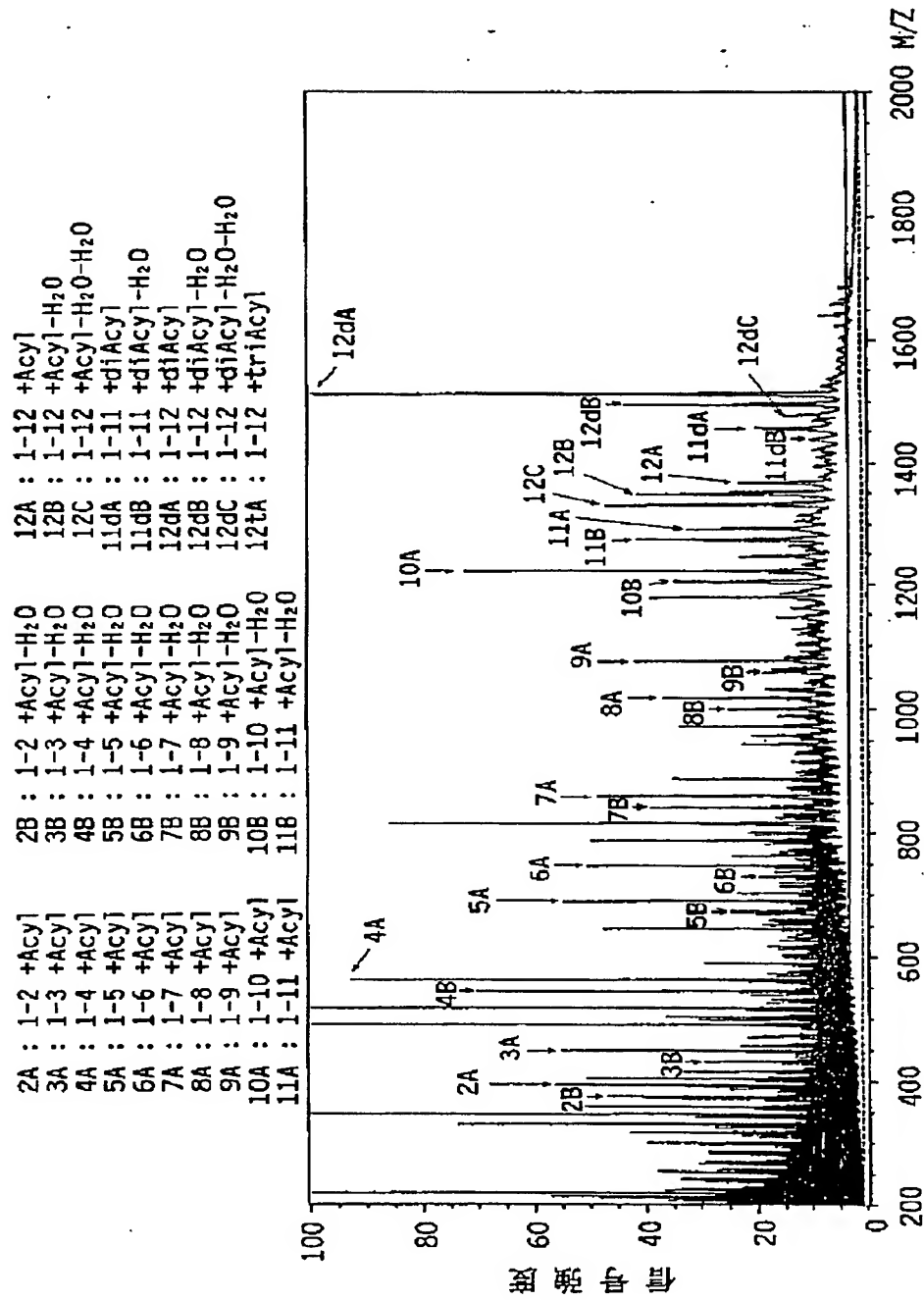
【図13】



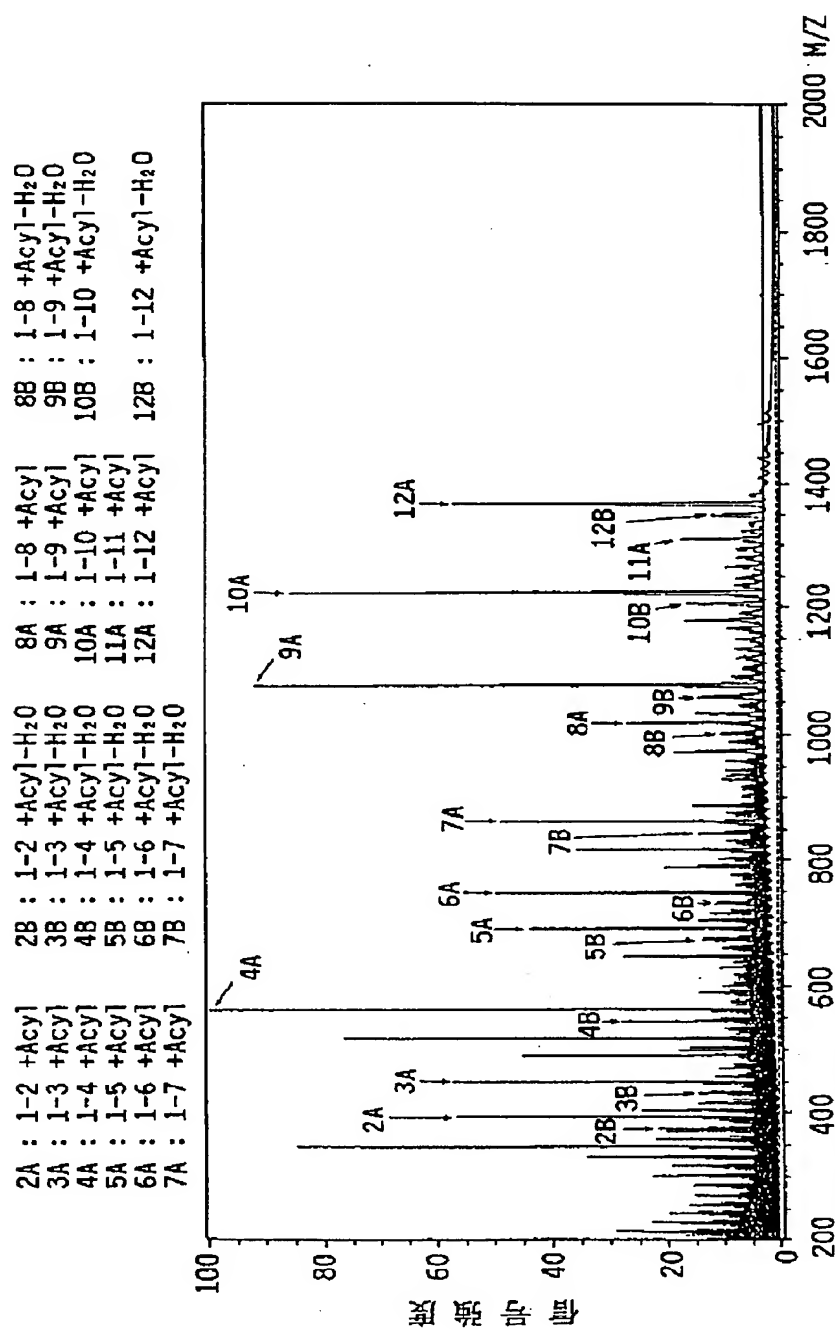
【 図 1 0 】



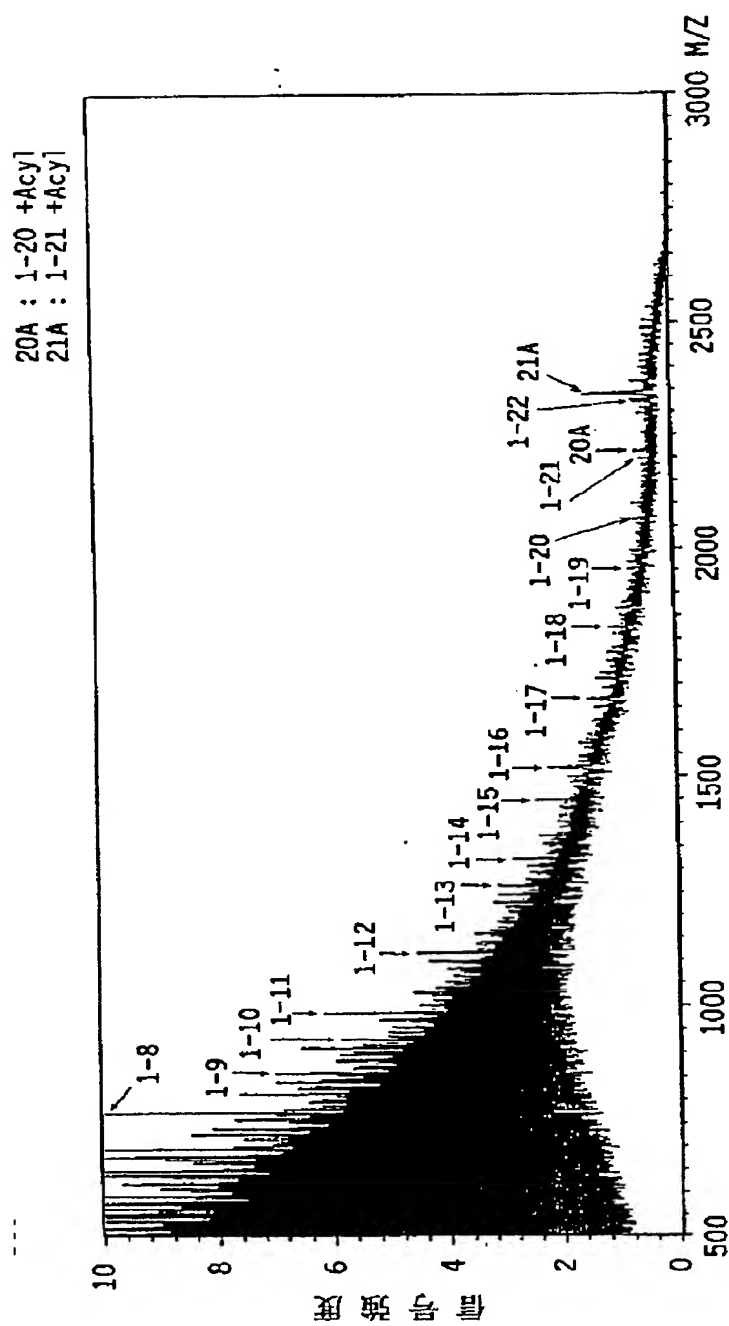
【図11】



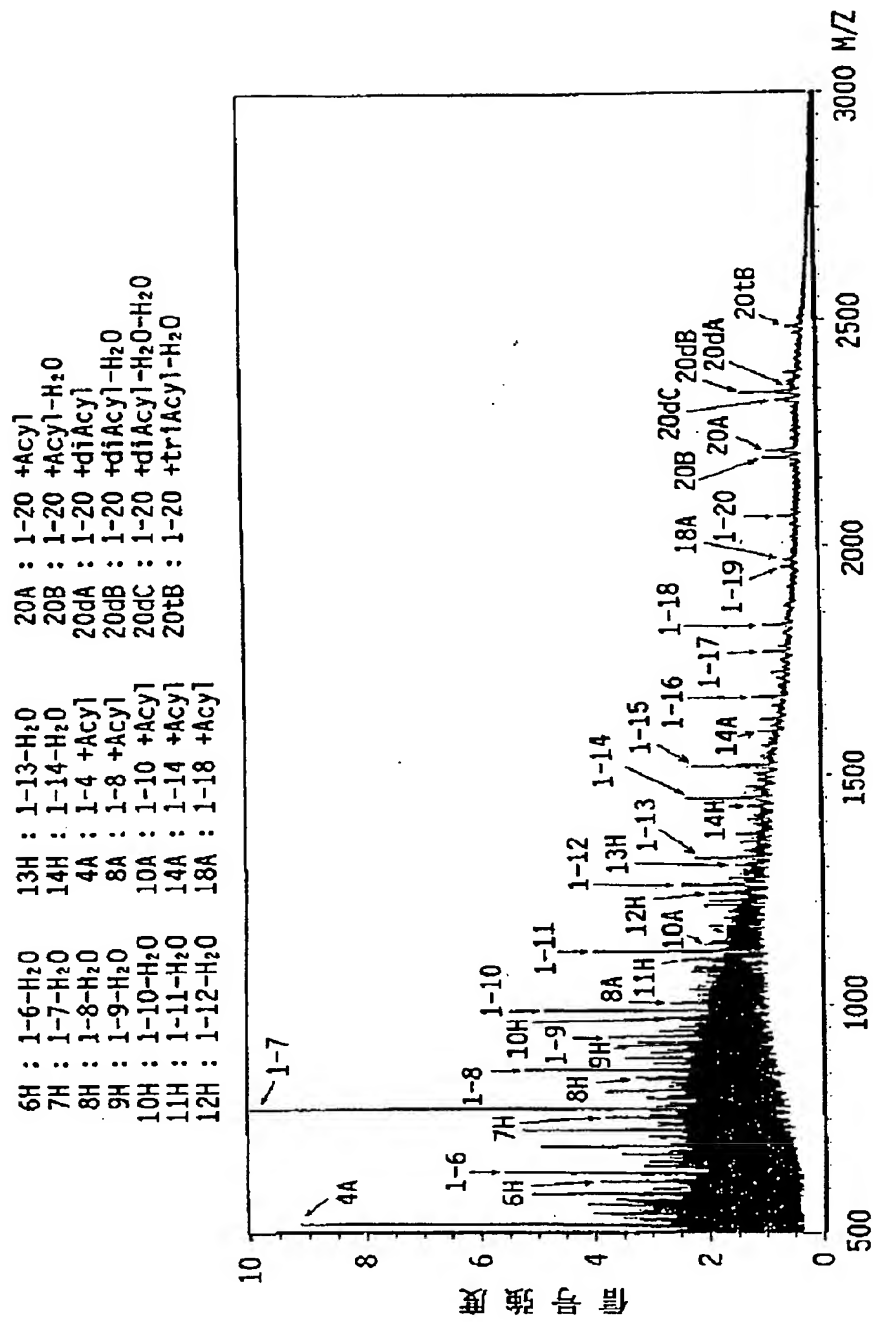
【図12】



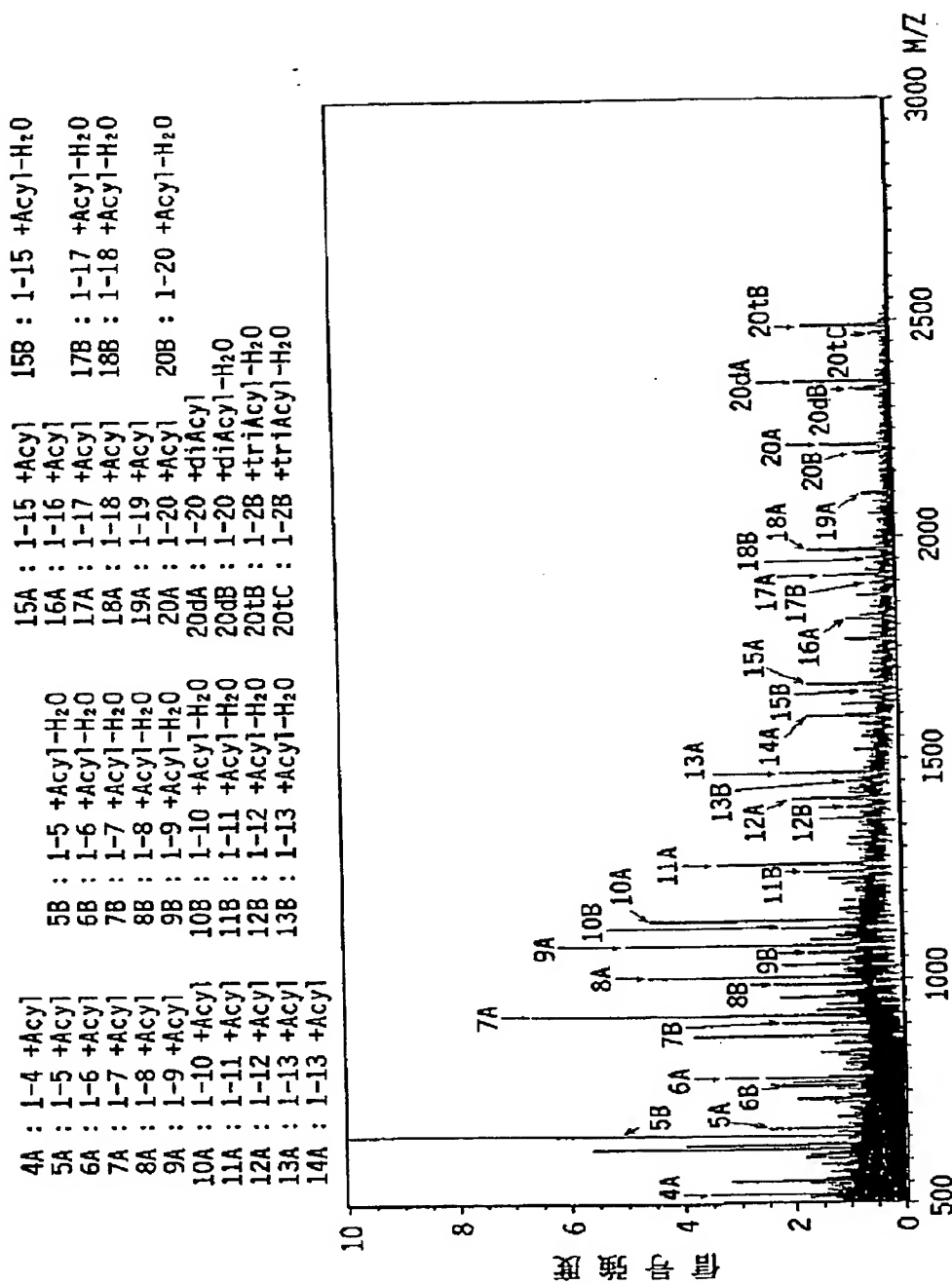
【 図 1 4 】



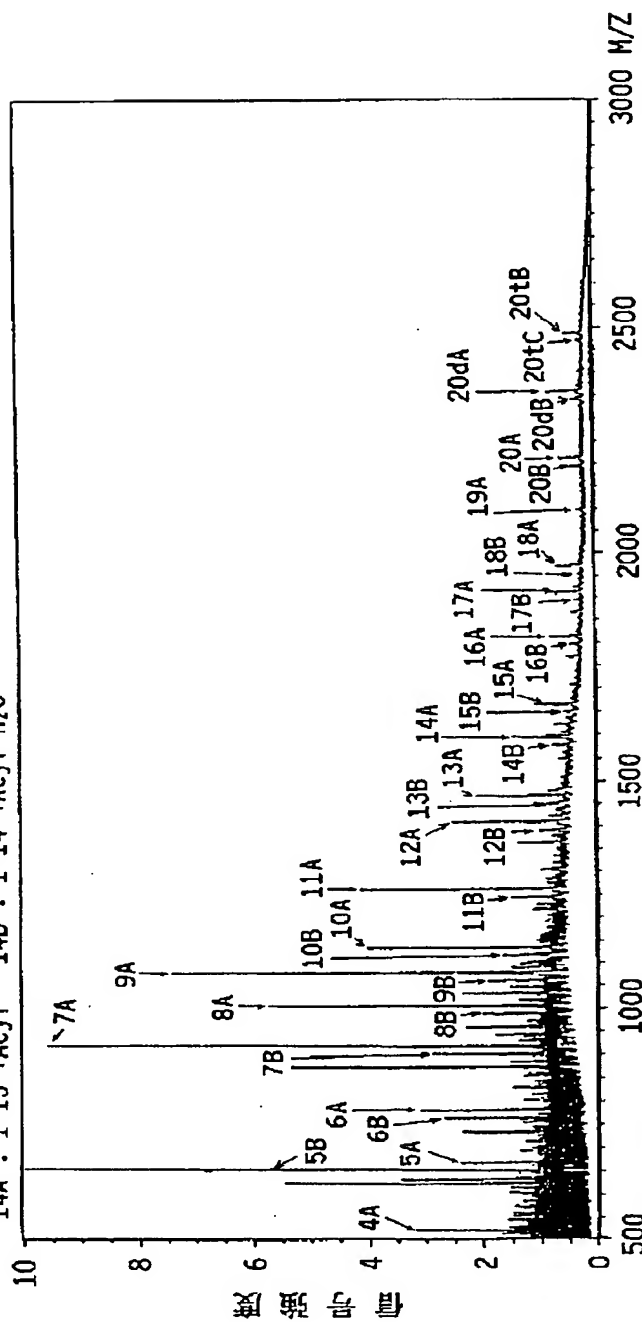
【図15】



【図 16】



5A : 1-5 +Acy1	4B : 1-4 +Acy1-H ₂ O	15A : 1-15 +Acy1	15B : 1-15 +Acy1-H ₂ O
6A : 1-6 +Acy1	5B : 1-5 +Acy1-H ₂ O	16A : 1-16 +Acy1	16B : 1-16 +Acy1-H ₂ O
7A : 1-7 +Acy1	6B : 1-6 +Acy1-H ₂ O	17A : 1-17 +Acy1	17B : 1-17 +Acy1-H ₂ O
8A : 1-8 +Acy1	7B : 1-7 +Acy1-H ₂ O	18A : 1-18 +Acy1	18B : 1-18 +Acy1-H ₂ O
9A : 1-9 +Acy1	8B : 1-8 +Acy1-H ₂ O	19A : 1-19 +Acy1	
10A : 1-10 +Acy1	9B : 1-9 +Acy1-H ₂ O	20A : 1-20 +Acy1	20B : 1-20 +Acy1-H ₂ O
11A : 1-11 +Acy1	10B : 1-10 +Acy1-H ₂ O	20dA : 1-20 +diAcy1	
12A : 1-12 +Acy1	11B : 1-11 +Acy1-H ₂ O	20dB : 1-20 +diAcy1-H ₂ O	
13A : 1-13 +Acy1	12B : 1-12 +Acy1-H ₂ O	20tB : 1-20 +triAcy1-H ₂ O	
14A : 1-13 +Acy1	13B : 1-13 +Acy1-H ₂ O	20tC : 1-20 +triAcy1-H ₂ O-H ₂ O	
	14B : 1-14 +Acy1-H ₂ O		



(72) 発明者 内田 豊明

東京都江東区亀戸6丁目31番1号 セイ
コー電子工業株式会社内

THIS PAGE BLANK (USPTO)